

丁二酸衍生物酯类化合物治疗痴呆症的用途

技术领域

本发明涉及旺拉提取物、丁二酸衍生物酯类化合物及其衍生物和药用盐在制备治疗痴呆；尤其是Alzheimer病、血管性痴呆的药物中的用途。

背景技术

目前我国人口的平均寿命已超过70岁。国外一项科学研究预测：到2025年时65岁及65岁以上的老年人将达到18.8%，这个数字表明，再过20余年，每5个人中就有1个老年人。早老性痴呆症（Alzheimer's Disease）多发生在50余岁。因脑血管病变引发的多发性栓塞性痴呆或老年性痴呆多发生在60岁以后。可见，由于人口的老龄化，早老性痴呆症和老年性痴呆症的发病率也必将增加。老年人及其特有的神经退化性疾病——各种痴呆症要经历两种死亡，首先是精神上的死亡，后是肉体上的死亡，苦不堪言，更给社会和家庭带来沉重负担。人口老龄化被认为是仅次于战争，瘟疫，饥荒，资源能源短缺而影响社会发展和安定的不利因素。

痴呆(dementia)是由于脑功能障碍而产生的获得性和持续性智能障碍综合症，智能障碍包括不同程度的记忆、语言、视空间功能、人格异常及认知能力降低，痴呆主要包括Alzheimer病、血管性痴呆等。Alzheimer病的病理改变包括老年斑的形成——主要由A β （ β -淀粉样蛋白）构成、胆碱能神经元丢失、A β 在血管内皮细胞中的沉积等。血管性痴呆是由脑血管性疾病引起的，主要是缺血。病理改变为多发性腔隙性病变或大面积梗死灶及动脉粥样硬化病变。近年的研究表明，老年性痴呆也有血管因素参与，脑血液灌流量不足是重要的危险因素。

防治衰老和治疗老年痴呆的药物种类繁多。目前临床上主要应用胆碱能药物或胆碱酯酶抑制剂来治疗,辅以改善脑血管循环、脑保护剂等,效果往往不甚理想。增强胆碱系统功能的药物中,Ach前体仅有微弱的治疗作用,Ach受体激动剂和胆碱脂酶抑制剂虽有一定效果,但作用较短暂,毒副作用较大。脑血管扩张药,通过改善脑血流量有助于提供能量和改善智能,但真正有价值的脑血管扩张药必须具有高度选择性,不影响脑代谢,无“窃血”现象,有抗血小板聚集和抗血栓作用。钙拮抗剂尼莫地平虽符合上述某些条件,但它仅作用于电压依赖性钙通道中的L-通道,对N型和T型钙通道无影响。多种神经肽和神经生长因子曾被认为有治疗痴呆症的希望,但临床效果不佳,可能主要归因于这类物质难以通过血脑屏障进入脑内发挥作用。2-吡咯烷酮乙酰胺(商品名脑复康)问世后,在早期文献中属没有争论的一类新型促智药,近几年来国内外报道,该药对各类型的记忆障碍和老年痴呆作用轻微或尚无定论,其为水溶性化合物,血脑屏障通过率低,不易集中到靶点发挥作用。

兰科植物凹舌兰 *Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Willd.) Richter分布广泛、主要分布于我国西藏、内蒙古、陕西、甘肃、青海等西部地区。其干燥块茎即为著名的藏药旺拉,具有补益气血、生津止渴、安神增智等功效,在藏、蒙等西部少数民族具有悠久的历史。

通过对该植物进行初步的生物活性筛选后,我们发现其块茎乙醇提取物具有较好的益智、镇静和抗疲劳活性,这与旺拉的药用功效完全一致。这一发现,促使本发明人对该植物进行全面系统的化学成分和生物活性的研究。通过进一步的化学成分和生物活性研究,从中分离得到了丁二酸衍生物酯类酯苷类。凹舌兰的化学成分本发明人已经公开(见黄胜阳,石建功,杨永春,胡世林.长苞凹舌兰的化学成分研究.药学学报,2002,37(3):199-203. Sheng Yang HUANG,

Jian Gong SHI, Yong Chun YANG, Shi Lin HU. Two new isobutyltartrate monoesters from *Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Willd.) Richter . Chinese Chemical Letters, 2002, 13(6): 551-554.) ,但是其生物活性方面的研究迄今未见报道。

发明内容

为了克服现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种如通式(I)所示的丁二酸衍生物酯类化合物在制备预防或治疗痴呆,尤其是Alzheimer病、血管性痴呆的药物中的应用。

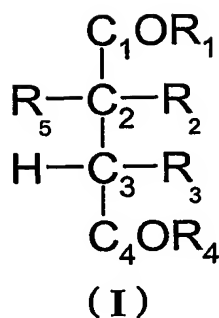
本发明的另一个目的是提供药物组合物,其中包括作为有效成分的如通式(I)所示的丁二酸衍生物酯类化合物,和制药领域中常用的载体。

本发明所述的化合物包括其衍生物、立体异构体和药效学上可接受的盐。

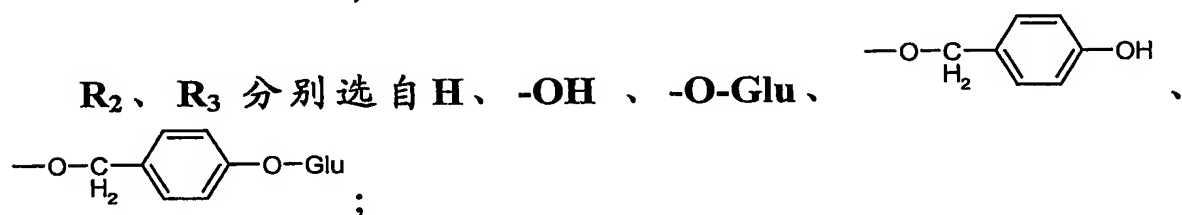
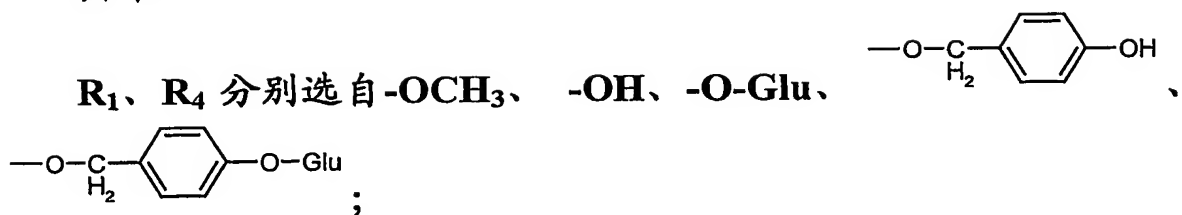
本发明的目的在于提供一种凹舌兰(*Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Willd.) Richter) 提取物在制备预防或治疗痴呆,尤其Alzheimer病、血管性痴呆的药物中的应用。

本发明的另一个目的是提供药物组合物,其中包括作为有效成分的凹舌兰(*Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Willd.) Richter) 提取物,和制药领域中常用的载体。

具体讲,本发明一方面涉及如通式(I)所示的化合物



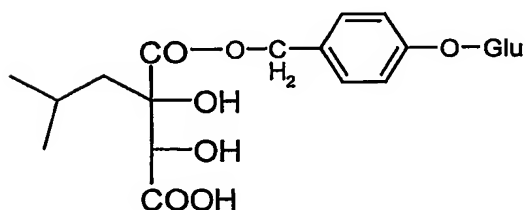
其中:



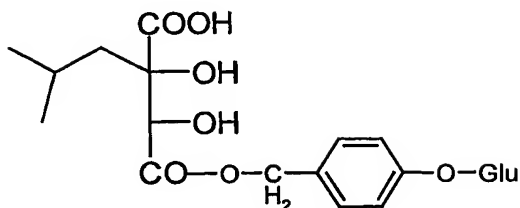
R_5 选自 C_{1-6} 的支链或支链的烷基, 优选甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、新丁基、异丁基、叔丁基, 更优选异丙基、新丁基、异丁基;

2、3 位手性中心 C 上的构型分别是 $2\text{R}3\text{S}$ 、 $2\text{R}3\text{R}$ 、 $2\text{S}3\text{S}$ 、 $2\text{S}3\text{R}$ 。

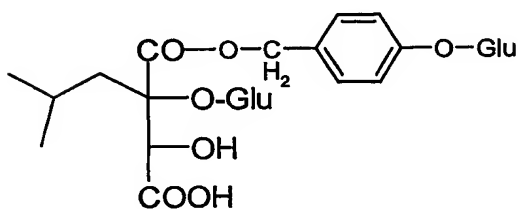
为完成本发明的目的, 优选的化合物包括但不限于:



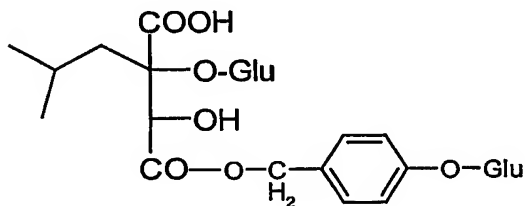
2,3-二羟基-2-异丁基-丁二酸-1-(4- β -D-吡喃葡萄糖氧基)苄酯
 (W1)



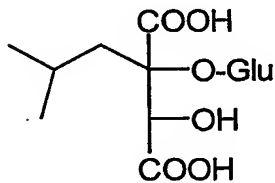
2,3-二羟基-2-异丁基-丁二酸-1-(4-β-D-吡喃葡萄糖氧基)苄酯
(W2)



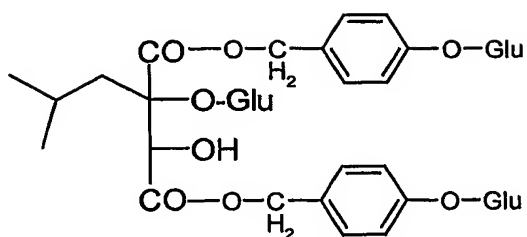
2-β-D-吡喃葡萄糖氧基-3-羟基-2-异丁基-丁二酸-1-(4-β-D-吡喃葡萄糖氧基)苄酯 (W3)



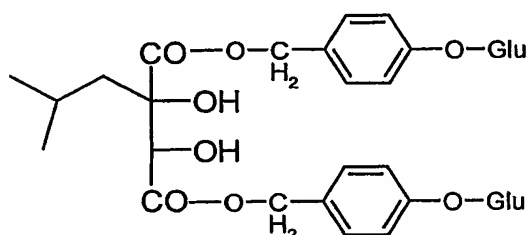
2-β-D-吡喃葡萄糖氧基-3-羟基-2-异丁基-丁二酸-4-(4-β-D-吡喃葡萄糖氧基)苄酯 (W4)



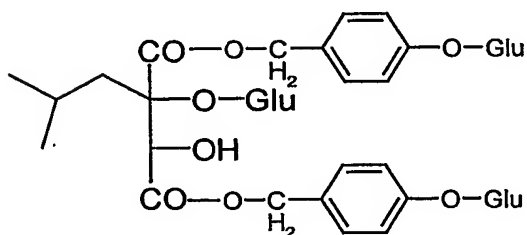
2-β-D-吡喃葡萄糖氧基-3-羟基-2-异丁基-丁二酸 (W5)



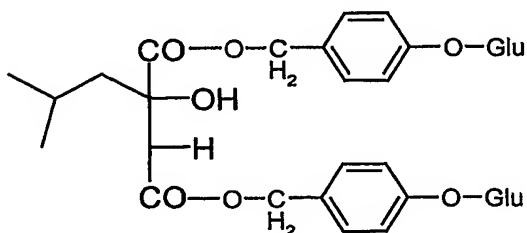
2-β-D-吡喃葡萄糖氧基-3-羟基-2-异丁基-丁二酸-1,4-二(4-β-D-吡喃葡萄糖氧基)苄酯 (W6)



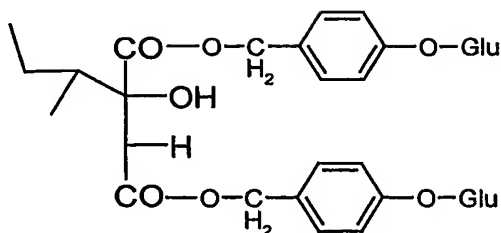
2,3-二羟基-2-异丁基-丁二酸-1,4-二(4-β-D-吡喃葡萄糖氧基)苄酯 (W7)



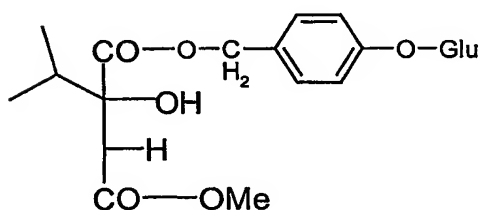
2-β-D-吡喃葡萄糖氧基-3-羟基-2-异丁基-丁二酸-1,4-二(4-β-D-吡喃葡萄糖氧基)苄酯 (W8)



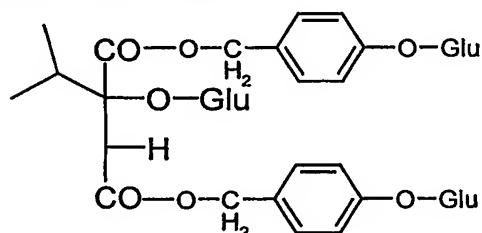
3-羟基-2-异丁基-丁二酸-1,4-二(4-β-D-吡喃葡萄糖氧基)苄酯 (W9)



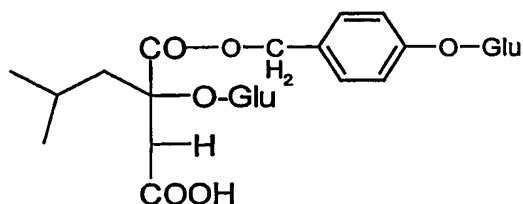
2-羟基-2-新丁基-丁二酸-1,4-二(4-β-D-吡喃葡萄糖氧基)苄酯
(W10)



2-羟基-2-异丙基-丁二酸-1-甲氧基-4-(4-β-D-吡喃葡萄糖氧基)苄酯 (W11)

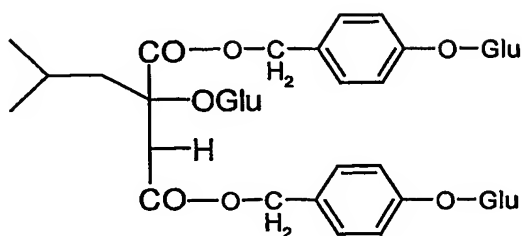


2-β-D-吡喃葡萄糖氧基-2-异丙基-丁二酸-1,4-二(4-β-D-吡喃葡萄糖氧基)苄酯 (W12)



2-β-D-吡喃葡萄糖氧基-2-异丁基-丁二酸-1-(4-β-D-吡喃葡萄糖

氧基)苄酯 (W13)



2-β-D-吡喃葡萄糖氧基-2-异丁基-丁二酸-1,4-二(4-β-D-吡喃葡萄糖氧基)苄酯 (W14)

在模仿乙酰胆碱分泌不足的东莨菪碱致痴呆模型中，跳台实验结果显示本发明的提取物和化合物均可以明显延长动物第一次跳下平台的潜伏期，同时减少错误次数，最小有效剂量很低。说明本发明的提取物和化合物能够有效改善抗胆碱药东莨菪碱导致的学习和记忆获得障碍，提高小鼠学习记忆的能力。

在AB致痴呆模型中，通过跳台法检测发现，服用本发明的提取物或化合物的小鼠和大鼠与模型组相比，第一次跳下平台的潜伏期显著延长，受电击的次数明显减少；通过水迷路法检测发现，服用本发明的提取物或化合物的小鼠与模型组相比，从起步区游到目标区所需时间明显缩短，进入盲端的次数显著减少。说明本发明的提取物和化合物能有效地改善脑室或海马内注射AB导致的小鼠和大鼠记忆和空间定向障碍，提高AB致痴呆模型动物学习记忆能力。

在永久性结扎小鼠双侧颈总动脉致痴呆模型中，通过跳台法检测发现，本发明的提取物和化合物能明显延长小鼠第一次跳下平台的潜伏期，有效的减少小鼠受电击的次数；通过水迷路法检测发现，本发明提取物和化合物能有效的缩短动物游出迷宫所需时间，减少动物进入盲端的次数。说明本发明的提取物和化合物对永久性结扎

双侧颈总动脉导致的小鼠记忆和空间定向障碍有明显的改善作用，提高该模型动物学习记忆能力。

在蛋白合成抑制剂环己烯亚胺致痴呆模型中，跳台实验结果显示本发明的提取物和化合物均可以明显延长动物第一次跳下平台的潜伏期，同时减少动物错误次数。说明本发明提取物和化合物均能够有效改善蛋白合成抑制剂环己烯亚胺导致的小鼠记忆巩固障碍，提高小鼠学习记忆的能力。

在考察本发明提取物对正常动物记忆力的影响中，水迷路法检测发现连续灌胃给药三天后小鼠游出迷宫所用的时间明显缩短，进入盲端的次数减少。提示本发明提取物对正常小鼠的学习记忆能力有增强作用。

在检测乙酰胆碱酯酶活性实验中，实验结果显示一次或多次灌胃给本发明的提取物和化合物对大、小鼠脑内乙酰胆碱酯酶的活性均没有明显影响。说明本发明的提取物和化合物改善拟痴呆动物学习记忆能力的作用机制不是通过抑制乙酰胆碱酯酶的活性。

在小鼠急性毒性实验中大剂量服用本发明的提取物和化合物的小鼠无任何特异反应，并且两周内体重增加。说明本发明化合物对小鼠的毒性很小或者几乎没有毒性。

药理实验表明了本发明的提取物和化合物对痴呆，尤其 Alzheimer 病、血管性痴呆具有较好的治疗作用，另外，对属于痴呆早期表现的轻度认知损害、记忆力减退和健忘等也具有相同的治疗作用。另外，本发明的提取物和化合物毒性低，安全性高，对乙酰胆碱酯酶的活性无抑制作用。

本发明因此还涉及含有作为活性成份的本发明的提取物或化合物和常规药物赋形剂或辅剂的药物组合物。通常本发明药物组合物含有 0.1-95 重量%的本发明提取物或化合物。

本发明化合物的药物组合物可根据本领域公知的方法制备。用于此目的时，如果需要，可将本发明的提取物或化合物与一种或多种固体或液体药物赋形剂和/或辅剂结合，制成可作为人药或兽药使用的适当的施用形式或剂量形式。

本发明提取物或化合物或含有它的药物组合物可以单位剂量形式给药，给药途径可为肠道或非肠道，如口服、肌肉、皮下、鼻腔、口腔粘膜、皮肤、腹膜或直肠等，优选口服。

本发明提取物或化合物或含有它的药物组合物的给药途径可为注射给药。注射包括静脉注射、肌肉注射、皮下注射和皮内注射等。

给药剂型可以是液体剂型、固体剂型。如液体剂型可以是真溶液类、胶体类、微粒剂型、乳剂剂型、混悬剂型。其他剂型例如片剂、胶囊、滴丸、气雾剂、丸剂、粉剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、颗粒剂、栓剂、冻干粉针剂等。

本发明提取物或化合物可以制成普通制剂、也可以是缓释制剂、控释制剂、靶向制剂及各种微粒给药系统。

为了将单位给药剂型制成片剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是，例如稀释剂与吸收剂，如淀粉、糊精、硫酸钙、乳糖、甘露醇、蔗糖、氯化钠、葡萄糖、尿素、碳酸钙、白陶土、微晶纤维素、硅酸铝等；湿润剂与粘合剂，如水、甘油、聚乙二醇、乙醇、丙醇、淀粉浆、糊精、糖浆、蜂蜜、葡萄糖溶液、阿拉伯胶浆、明胶浆、羧甲基纤维素钠、紫胶、甲基纤维素、磷酸钾、聚乙烯吡咯烷酮等；崩解剂，例如干燥淀粉、海藻酸盐、琼脂粉、褐藻淀粉、碳酸氢钠与枸橼酸、碳酸钙、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等；崩解抑制剂，例如蔗糖、三硬脂酸甘油酯、可可脂、氢化油等；吸收促进剂，例如季铵盐、十二烷基硫酸钠等；润滑剂，例如滑石粉、二氧化硅、玉米淀粉、硬脂酸盐、硼酸、液体石蜡、聚乙二醇等。还可以将片

剂进一步制成包衣片，例如糖包衣片、薄膜包衣片、肠溶包衣片，或双层片和多层片。

例如为了将给药单元制成丸剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是，例如稀释剂与吸收剂，如葡萄糖、乳糖、淀粉、可可脂、氢化植物油、聚乙烯吡咯烷酮、Gelucire、高岭土、滑石粉等；粘合剂，如阿拉伯胶、黄蓍胶、明胶、乙醇、蜂蜜、液糖、米糊或面糊等；崩解剂，如琼脂粉、干燥淀粉、海藻酸盐、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等。

例如为了将给药单元制成胶囊，将有效成分本发明提取物或化合物与上述的各种载体混合，并将由此得到的混合物置于硬的明胶胶囊或软胶囊中。也可将有效成分本发明化合物制成微囊剂，混悬于水性介质中形成混悬剂，亦可装入硬胶囊中或制成注射剂应用。

例如，将本发明提取物或化合物制成注射用制剂，如溶液剂、混悬剂溶液剂、乳剂、冻干粉针剂，这种制剂可以是含水或非水的，可含一种和/或多种药效学上可接受的载体、稀释剂、粘合剂、润滑剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂。如稀释剂可选自水、乙醇、聚乙二醇、1,3-丙二醇、乙氧基化的异硬脂醇、多氧化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯等。另外，为了制备等渗注射液，可以向注射用制剂中添加适量的氯化钠、葡萄糖或甘油，此外，还可以添加常规的助溶剂、缓冲剂、pH调节剂等。这些辅料是本领域常用的。

此外，如需要，也可以向药物制剂中添加着色剂、防腐剂、香料、矫味剂、甜味剂或其它材料。

为达到用药目的，增强治疗效果，本发明的药物或药物组合物可用任何公知的给药方法给药。

本发明提取物或化合物、药物组合物的给药剂量取决于许多因素，例如所要预防或治疗疾病的性质和严重程度，患者或动物的性别、年龄、体重、性格及个体反应，给药途径、给药次数、治疗目

的，因此本发明的治疗剂量可以有大范围的变化。一般来讲，本发明中药学成分的使用剂量是本领域技术人员公知的。可以根据本发明化合物组合物中最后的制剂中所含有的实际药物数量，加以适当的调整，以达到其治疗有效量的要求，完成本发明的预防或治疗目的。本发明化合物的每天的合适剂量范围本发明的提取物或化合物的用量为 0.001—150mg/Kg 体重，优选为 0.01—100mg/Kg 体重，更优选为 0.01—60mg/Kg 体重，最优选为 0.1—10mg/Kg 体重。上述剂量可以单一剂量形式或分成几个，例如二、三或四个剂量形式给药这受限于给药医生的临床经验以及包括运用其它治疗手段的给药方案。

每一种治疗所需总剂量可分成多次或按一次剂量给药。本发明的提取物、化合物、组合物可单独服用，或与其他治疗药物或对症药物合并使用并调整剂量。

本发明的化合物存在于凹舌兰属(*Coeloglossum*)、山珊瑚属(*Galeola*)、天麻属(*Gastrodia*)、*Loroglossum* 属、红门兰属(*Orchis*)和万代兰属(*Vanda*)等 6 属植物中(见下表)。

兰科植物中的本发明化合物

编号	化合物名称	分子式	分子量	来源植物
1	W1	$C_{21}H_{30}O_{12}$	474	a
2	W2	$C_{21}H_{30}O_{12}$	474	a
3	W3	$C_{27}H_{40}O_{17}$	636	a
4	W4	$C_{27}H_{40}O_{17}$	636	a
5	W7	$C_{34}H_{46}O_{18}$	742	a, f, g, h
6	W6	$C_{40}H_{56}O_{23}$	904	a, f
7	W13	$C_{27}H_{40}O_{16}$	620	a, f
8	W11	$C_{21}H_{30}O_{11}$	458	c
9	W12	$C_{33}H_{44}O_{17}$	712	b, c
10	W10	$C_{34}H_{46}O_{17}$	726	b

11	W9	$C_{34}H_{46}O_{17}$	726	f, g
12	W14	$C_{40}H_{56}O_{25}$	888	f

a: *Coeloglossum viride* ; b: *Galeola faberi* ; c: *Galeola septentrionalis* ; d: *Gastrodia elata* ;

e: *Loroglossum hircinum* ; f: *Orchis latifolia* ; g: *Orchis militaris* ; h: *Orchis papilionacea* .

附图说明

图 1 旺拉提取分离流程图。

图 2 小鼠各天的到达目标区所需时间。

图 3 小鼠各天的错误次数。

具体实施方式

下面的实施例用来进一步说明本发明，但是这并不意味着对本发明的任何限制。

CE: 为从旺拉中提取的有效部位；

W6、W7、W8、W9: 为从CE中分离到的化合物

制备例 本发明提取物和化合物的制备

凹舌兰块茎粗粉 5Kg, 用 8 倍量 95% EtOH加热回流提取 3 次, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩后得到EtOH浸膏 220g。将浸膏加水稀释, 用EtOAC萃取, 水相浓缩、过滤, 进行大孔吸附树脂柱层析, 依次用水和 20 %、40 %、60 %、80 % EtOH洗脱。20 %和 40 %EtOH洗脱液回收溶剂得提取物CE, 用水溶解, 分别进行Rp-18反相硅胶柱层析, 以MeOH-H₂O (MeOH, 0 → 60%) 梯度洗脱, 得到的各流份经薄层检查, 组分相同者合并, 再利用重结晶、硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析、反相制备柱HPLC等多种方法进行纯化, 分别得到化合物W1 (70mg)、W2 (95mg)、W3 (85mg)、

W4 (173mg)、W5 (65mg)、W6 (4.2g)、W7 (4.8g)、W8 (3.4g)、W9 (1.2g)。见附图 1。

药理实验

实施例 1. 本发明提取物和化合物提高东莨菪碱致痴呆模型小鼠学习记忆的能力

实验目的：老年性痴呆以基底前脑胆碱能神经元丢失最为严重，造成乙酰胆碱分泌不足。东莨菪碱为M胆碱受体阻断剂，能抑制乙酰胆碱对M受体的激动作用，因此可模仿乙酰胆碱分泌不足的结果，是研究老年性痴呆的动物模型之一。

实验方法：跳台法：雄性ICR小鼠，随机分组，每组 20 只，设正常对照组、模型组（东莨菪碱组）及多个给药组。给小鼠灌胃受试药物二次后腹腔注射东莨菪碱（1mg/kg），30 分钟后将小鼠放入反应箱内的平台上，反应箱的底部为铜栅，通以 36 伏交流电，反应箱内一角为一平台，无电，动物跳下平台即受到电击，跳回平台可躲避伤害性刺激，训练 5 分钟，24 小时后重做试验，此即记忆获得和保持测试，记录小鼠受电击的动物数、第一次跳下平台潜伏期及 5 分钟内的错误次数。

实验结果：与正常对照组相比，东莨菪碱组小鼠第一次跳下平台的潜伏期明显缩短，受电击的次数明显增多，提示东莨菪碱能显著破坏动物的记忆获得。与模型组比较，CE、W6、W7、W8 和 W9 均可以明显延长动物第一次跳下平台的潜伏期，同时减少错误次数，提示本发明提取物和化合物能够有效改善抗胆碱药东莨菪碱导致的小鼠的记忆获得障碍。

表 1.CE 等对东莨菪碱致记忆获得障碍小鼠跳台实验结果的影响

组别	剂量(mg/kg)	潜伏期 (秒)	错误次数
正常对照组		266 ± 20	0.2 ± 0.1
模型组		$147 \pm 32\#$	$1.7 \pm 0.4\#\#$
CE	2.5	$218 \pm 19^*$	$0.2 \pm 0.1^{**}$
	5	$245 \pm 22^*$	$0.4 \pm 0.2^*$
	10	$280 \pm 27^{**}$	$0.6 \pm 0.2^*$
W6	0.03	$283 \pm 38^{**}$	$0.2 \pm 0.1^{**}$
	0.3	$259 \pm 34^*$	$0.4 \pm 0.2^*$
	3	$258 \pm 17^*$	$0.3 \pm 0.1^*$
W7	0.25	205 ± 142	$0.4 \pm 0.7^*$
	1	$237 \pm 125^*$	$0.2 \pm 0.4^{**}$
W8	0.25	197 ± 144	0.7 ± 0.9
	1	$218 \pm 127^*$	$0.3 \pm 0.5^*$
W9	0.25	140 ± 129	0.8 ± 0.7
	1	$210 \pm 134^*$	$0.4 \pm 0.5^*$

表中潜伏期和错误次数的数据表示为 Mean \pm SEM, n=20, #:p<0.05, ##:p<0.01,与正常对照组比较. *:p<0.05, **:p<0.01,与模型组比较。

实施例 2. 本发明提取物和化合物改善环己烯亚胺(cycloheximide, CHX)致痴呆模型小鼠学习记忆的能力

实验目的: 环己烯亚胺是一种蛋白质合成抑制剂,可造成动物记忆巩固障碍,是研究促智药的常用动物模型之一。

实验方法: 雄性ICR小鼠,随机分组,每组 20 只,设正常对照组、模型组(CHX)、多个给药组。给小鼠灌胃受试药物二次后,除正常对照组外,其余组小鼠均腹腔注射CHX (120 mg/kg), 30 分钟后将小鼠放进跳台箱中先适应环境 3 分钟,然后给定电压 36V, 5 分钟,使小鼠学会逃避电击。24h后进行记忆测试,记录小鼠第一次跳下平台的潜伏期及分钟内跳下平台的次数(或称错误次数)。

实验结果: CE和W6 可以明显延长动物第一次跳下平台的潜伏期, 同时减少 5min内跳下平台的次数。提示本发明提取物和化合物均能够有效改善蛋白合成抑制剂环己烯亚胺导致的小鼠记忆巩固障碍, 提高小鼠学习记忆的能力。

表 2.对环己烯亚胺致记忆巩固障碍小鼠学习记忆的影响

分组	剂 量 (mg/kg)	潜伏期(s)	改善率(%)	错误次数 (次)
对照		255 ± 16		0.2 ± 0.1
模型组		174 ± 20###		1.0 ± 0.2###
CE	2.5	183 ± 31	11	0.7 ± 0.2
	5	217 ± 20	53	0.5 ± 0.1**
	10	231 ± 33	70	0.4 ± 0.1*

分组	剂量(mg/kg)	潜伏期(秒)	改善率 (%)	错误次数(次)
对照		276 ± 17		0.1 ± 0.3
模型组		124 ± 30###		1.6 ± 1.9##
W6	1.25	211±31	57	0.6 ± 1.2
	2.5	223±24*	65	0.7±0.9*
	5	182±33	38	0.4±0.5**
	10	216 ± 29*	61	0.3 ± 0.5**

表中数据为 Mean ± SEM, ##:p<0.01, ###:p<0.001,与正常对照组比较; *:p<0.05, **:p<0.01, 与模型组比较。

实施例 3. 本发明提取物和化合物提高AB致痴呆模型小鼠学习记忆能力

实验目的: 老年性痴呆(AD)的特征性病理变化是大脑出现老年斑, 而β-淀粉样蛋白(AB)沉积是构成老年斑的核心。有研究表明,

AB对神经细胞具有毒性。本实验的目的是观察CE和W6对AB致痴呆模型小鼠学习记忆能力的影响。

实验方法：① 雄性ICR小鼠，每组 12 只，模型组和给药组小鼠双侧侧脑室注射AB(1-42)，10 微克/只，假手术组小鼠注射相同体积的生理盐水，一周后给药组小鼠开始灌胃给药，模型组和假手术组小鼠灌胃给生理盐水，给药二周后用跳台法和水迷路法检测所有动物的学习记忆情况。

水迷路法：在水迷宫装置内加入水，在目标区有一爬梯，动物可爬出水面而获得休息。首先训练动物三天，每天逐渐延长动物起步区至目标区的游泳路径，同时增加盲端区，第四天记录小鼠从起步区游泳到达目标区所需时间和进入盲端的次数，观察时间为 2 分钟。该方法可检测动物空间定向和学习记忆的能力。

② 雄性Wistar大鼠，模型组和给药组大鼠双侧海马内注射AB(1-42)，10 微克/侧，假手术组大鼠双侧海马内各注射相同体积的生理盐水，给药组连续灌胃给药，模型组和假手术组大鼠灌胃给生理盐水，三周后用跳台法检测所有动物学习和记忆情况，每组 10 只动物。

实验结果：在跳台实验中，脑室或海马内注射AB组与假手术组相比，动物第一次跳下平台的潜伏期明显缩短，受电击的次数明显增多，提示脑室或海马内注射AB(1-42)可造成动物学习记忆障碍；给药组与模型组相比，2 个受试药均能有效的减少小鼠受电击的次数，明显延长小鼠第一次跳下平台的潜伏期。在水迷路实验中，脑室注射AB组与假手术组相比，从起步区到达目标区所需时间明显延长，其间动物进入盲端的次数明显增多；给药组与模型组相比，2 个受试药均能有效的缩短动物游出迷宫的时间，减少动物进入盲端的次数。提示本发明提取物和化合物可以有效地改善脑室或海马内注射AB(1-42)导致的小鼠学习记忆和空间定向障碍。

表 3. CE等对A β 致痴呆模型小鼠跳台实验结果的影响

组别	剂量 (mg/kg)	潜伏期 (秒)	受电击次数
假手术组		156 \pm 35	1.3 \pm 0.3
模型组		30 \pm 14###	1.6 \pm 0.2
CE	5	118 \pm 34*	1.4 \pm 0.3
W6	1	110 \pm 37*	0.9 \pm 0.2

表 4. CE等对A β 致痴呆模型小鼠水迷宫实验结果的影响

组别	剂量(mg/kg)	游出时间 (秒)	进入盲端次数
假手术组		34 \pm 8	4.3 \pm 1.1
模型组		62 \pm 10#	6.4 \pm 1.1#
CE	5	36 \pm 10*	3.1 \pm 1.4*
W6	1	46 \pm 11	3.1 \pm 0.8*

表 5. CE等对A β 致痴呆模型大鼠跳台实验结果的影响

组别	剂量 (mg/kg)	潜伏期 (秒)	受电击次数
假手术组		241 \pm 39	0.2 \pm 0.1
模型组		107 \pm 34#	1.3 \pm 0.3#
CE	1.25	188 \pm 69*	0.4 \pm 0.2
	5.0	237 \pm 42*	0.2 \pm 0.1*

表中数据为 Mean \pm SEM, #:p<0.05,与正常对照组比较; *:p<0.05,与模型组比较。

实施例 4. 本发明提取物和化合物提高永久性结扎小鼠双侧颈总动脉致痴呆模型小鼠学习记忆能力

实验目的: 血管性痴呆是由脑血管疾病所致的认知功能障碍, 主要原因是脑缺血。近年的研究表明, 老年性痴呆也有血管因素参与, 脑血液灌流量不足是重要的危险因素。本实验的目的是观察CE和W6 对永久性结扎小鼠双侧颈总动脉致痴呆模型小鼠学习记忆功

能的影响。

实验方法：永久性结扎小鼠双侧颈总动脉，一周后给药组小鼠开始灌胃给药，模型组和假手术组小鼠灌胃给生理盐水，在手术后第四周用跳台法和小鼠水迷路法检测动物学习记忆情况。

实验结果：结扎小鼠双侧颈总动脉 4 周后，在跳台实验中，模型组与假手术组相比，动物第一次跳下平台的潜伏期明显缩短，受电击的次数明显增多；提示模型组动物有学习记忆障碍；给药组与模型组相比，2 个受试药均能有效的减少小鼠受电击的次数，明显延长小鼠第一次跳下平台的潜伏期。在水迷路实验中，模型组与假手术组相比，动物进入盲端的次数明显增多，游出迷宫所需时间明显延长；提示模型组动物在空间定向和记忆方面有障碍；给药组与模型组相比，2 个受试药均能有效的缩短动物游出迷宫所需时间，减少动物进入盲端的次数。提示本发明提取物和化合物对永久性结扎双侧颈总动脉导致的小鼠记忆和空间定向障碍有明显的改善作用。

表 6. CE 等对结扎双侧颈总动脉致痴呆模型小鼠跳台实验结果的影响

分组	剂量 (mg/kg)	潜伏期 (秒)	受电击次数
假手术组		256 ± 40	0.3 ± 0.2
模型组		125 ± 38#	0.9 ± 0.2#
CE	5	245 ± 30*	0.2 ± 0.2*
W6	1	253 ± 31*	0.2 ± 0.1*

表 7. CE 等对结扎颈总动脉致痴呆模型小鼠水迷路实验结果的影响

分组	剂量 (mg/kg)	游出时间 (秒)	进入盲端次数
假手术组		25 ± 14	4.0 ± 0.3
模型组		51 ± 24###	7.5 ± 0.7#
CE	5	22 ± 11***	4.3 ± 0.5*
W6	1	33 ± 19*	5.4 ± 1.4

表中数据为 Mean ± SEM, #:p<0.05, ##:p<0.01,与正常对照组比较.

*: $p<0.05$, **: $p<0.001$, 与模型组比较。

实施例 5. 本发明提取物对正常小鼠的学习记忆能力的作用

实验目的: 采用水迷路法观察CE是否有增强正常小鼠记忆的作用。

实验方法: 雄性ICR小鼠, 随机分组, 每组 20 只, 设正常对照组、和 2 个给药组。给小鼠灌胃受试药物三天后, 在水迷路中训练动物三天, 每天逐渐延长动物起步区至目标区的游泳路径, 同时增加盲端区, 从第四天记录小鼠从起步区游泳到达目标区所需时间和进入盲端的次数, 观察时间为 2 分钟。该方法可检测动物空间定向和学习记忆的能力。见附图 2 和 3。

实验结果: 连续灌胃给CE(1.25 和 5 mg/kg)能有效缩短小鼠游出迷宫的时间, 减少进入盲端的次数。提示本发明提取物对正常小鼠的学习记忆能力有增强作用。

实施例 6 本发明提取物和化合物的小鼠急性毒性实验

实验方法: 小鼠一次性腹腔注射或口服 5 g/kg的CE 或 0.5 g/kg剂量的化合物W6、W7、 W8 和W9 后, 观察两周内对小鼠的影响。

实验结果: 给药后小鼠无任何特异反应, 并且两周内体重增加。说明化合物W6、W7、 W8 和W9 对小鼠的毒性很小或者几乎没有毒性。小鼠急性毒性实验显示本发明提取物和化合物的毒性很小或者几乎没有毒性。

实施例 7 本发明提取物和化合物对乙酰胆碱酯酶活性的影响:

实验目的: 乙酰胆碱是与学习记忆密切相关的中枢神经递质, 胆碱能神经的退变最终导致乙酰胆碱浓度降低, 因此目前许多老年

性痴呆的治疗措施是以使用胆碱酯酶抑制剂来增加乙酰胆碱的浓度为基础的。本试验的目的是初步探索本发明化合物的作用机理,了解本发明提取物和化合物对动物脑内乙酰胆碱酯酶活性是否有影响。

实验方法: Wistar大鼠,随机分为5组,每组6只:正常对照组、阳性药对照组(石杉碱甲)、CE组(5 mg/kg)、W6组(5 mg/kg)和W6组(20 mg/kg)。动物禁食12小时后灌胃给药一次,1小时后断头处死动物,在冰浴条件下迅速取出前脑,加入生理盐水用超声粉碎器制成10%脑匀浆,低温下离心20分钟(6000rpm),取上清。按照乙酰胆碱酯酶测定试剂盒说明书进行操作(购自南京建成生物工程研究所)。

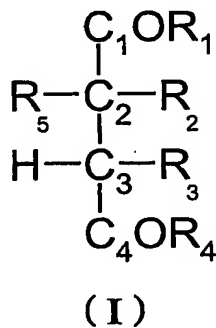
实验结果: CE和W6对大鼠脑内乙酰胆碱酯酶活性均没有明显影响。表明本发明提取物和化合物改善痴呆动物学习记忆能力的作用机制不是通过抑制乙酰胆碱酯酶活性从而提高中枢乙酰胆碱浓度这一途径。

表 8.对大鼠脑内ACHE的影响

分组	ACHE 活性	抑制率 (%)
正常对照组	0.72 ± 0.18	--
石杉碱甲 1 mg/kg	0.48 ± 0.10*	34
CE 5 mg/kg	0.77 ± 0.20	0
W6 5 mg/kg	0.80 ± 0.16	0
W6 20 mg/kg	0.72 ± 0.16	0

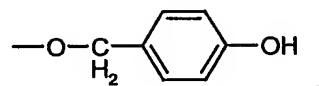
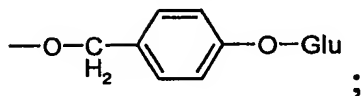
权 利 要 求

1、如通式 (I) 所示的丁二酸衍生物酯类化合物在制备预防或治疗痴呆的药物中的应用:

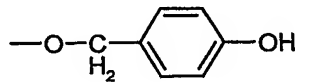
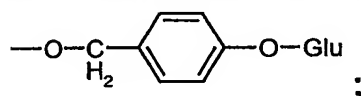


其中:

R_1 、 R_4 分别选自 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{O-Glu}$ 、



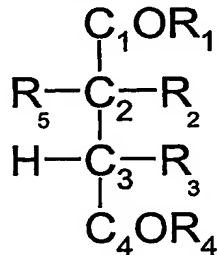
R_2 、 R_3 分别选自 H 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{O-Glu}$ 、



R_5 选自 C_{1-6} 的支链或支链的烷基;

2、3 位手性中心 C 上的构型分别是 2R3S、2R3R、2S3S、2S3R。

2、根据权利要求 1 的应用, 其特征在于, 所述的式 (I) 化合物为

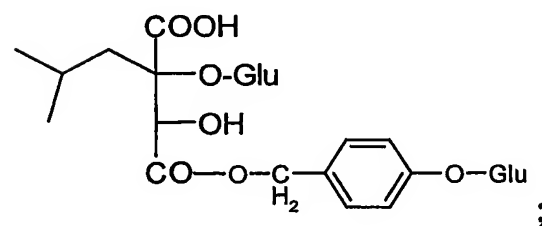
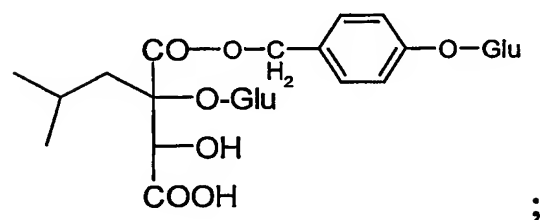
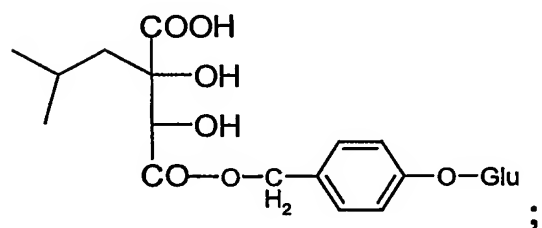
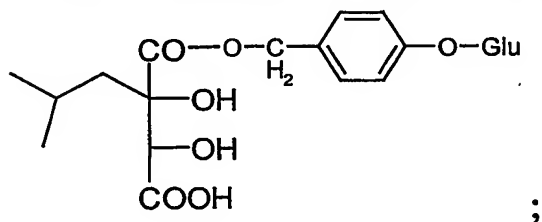


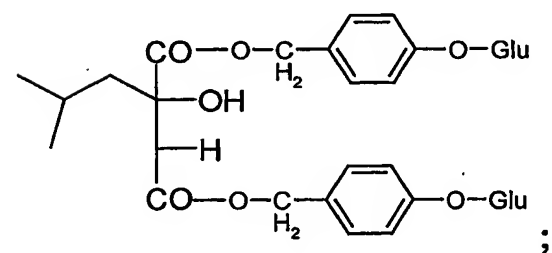
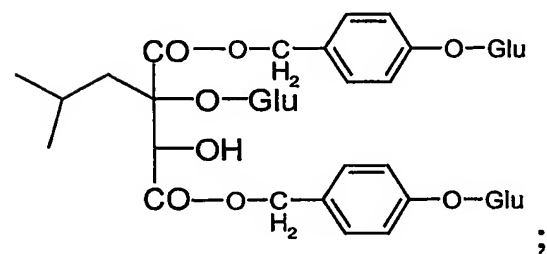
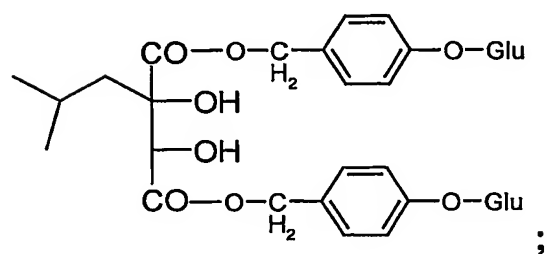
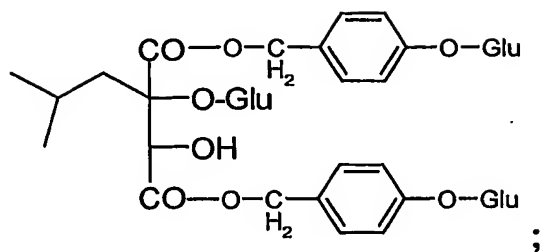
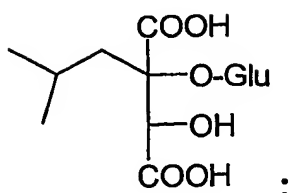
(I)

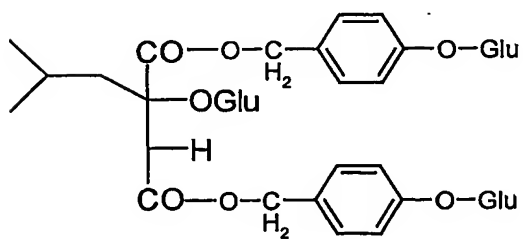
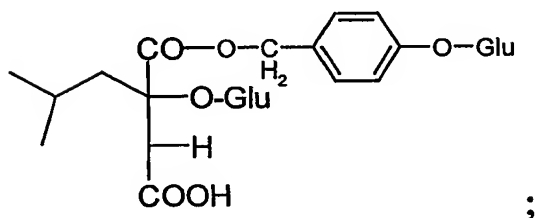
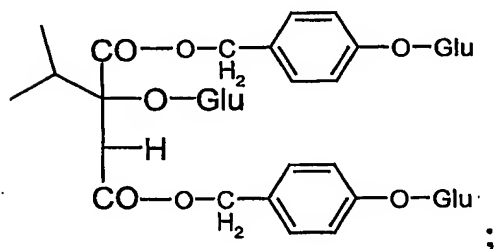
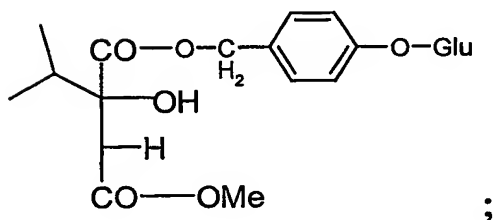
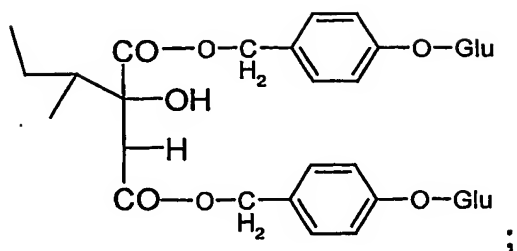
其中, R_5 选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、新丁基、异丁基、叔丁基,

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 的和权利要求 1 相同。

3、根据权利要求 2 的应用, 其特征在于, 所述的化合物包括







4、根据权利要求 1-3 的应用，其特征在于，所述的化合物包括立体异构体和药效学上可接受的盐。

5、根据权利要求 1 的应用，其特征在于，所述的痴呆包括 Alzheimer 病、血管性痴呆、学习记忆障碍。

6、一种药物组合物，其特征在于，含有药物有效剂量的如权利要求 1-4 所述的任一化合物，及药用载体。

7、根据权利要求 6 的药物组合物，其特征在于，所述的药物组合物可以是片剂、胶囊、丸剂、注射剂、缓释制剂、控释制剂及各种微粒给药系统。

8、凹舌兰(*Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Willd.) Richter) 提取物在制备预防或治疗痴呆的药物中的应用。

9、根据权利要求 8 的应用，其特征在于，所述的痴呆包括 Alzheimer 病、血管性痴呆、学习记忆障碍。

10、一种药物组合物，其特征在于，含有药物有效剂量的如权利要求 8 所述的提取物，及药用载体。

11、根据权利要求 10 的药物组合物，其特征在于，所述的药物组合物可以是片剂、胶囊、丸剂、注射剂、缓释制剂、控释制剂及各种微粒给药系统。

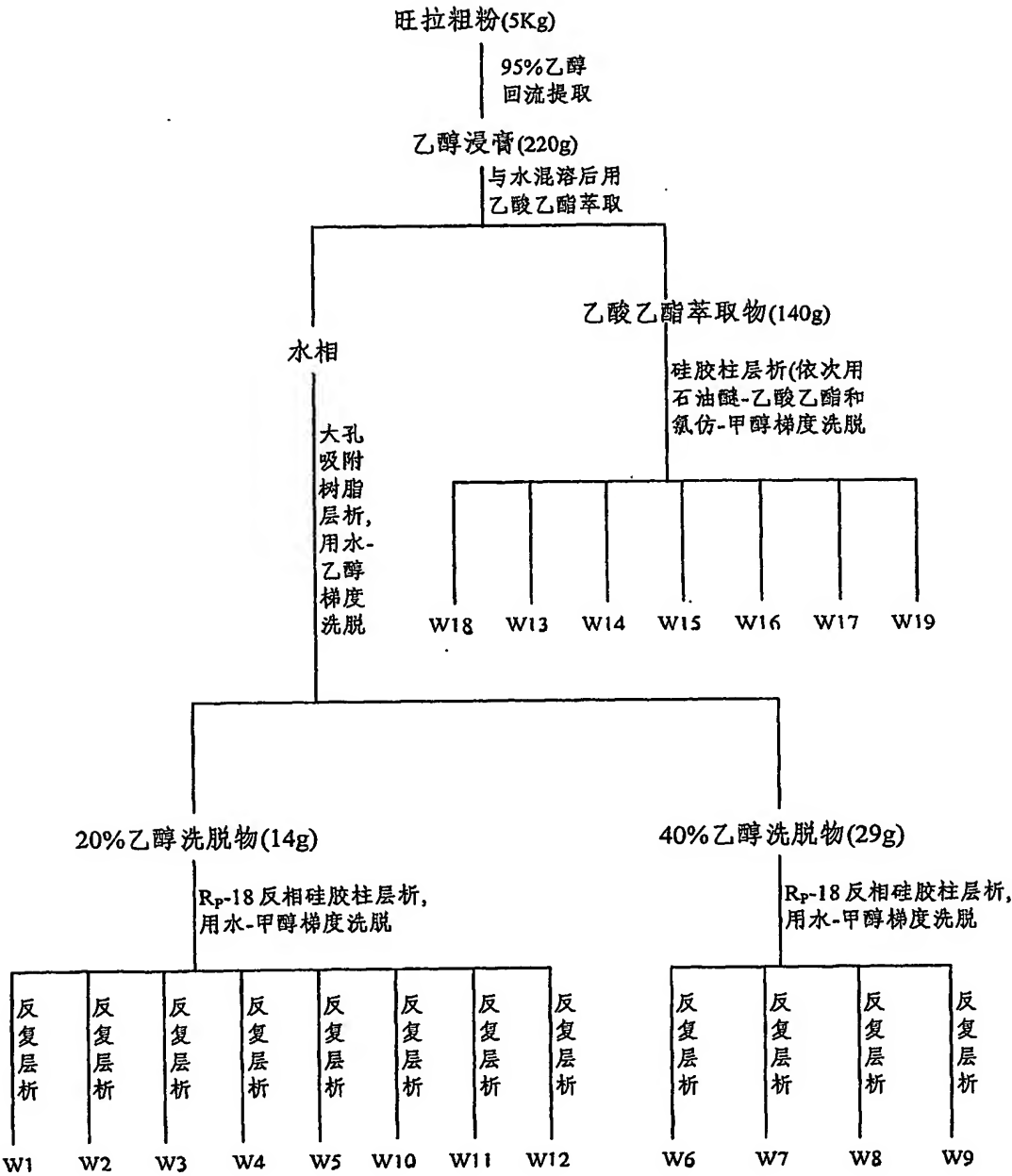


Fig. 1

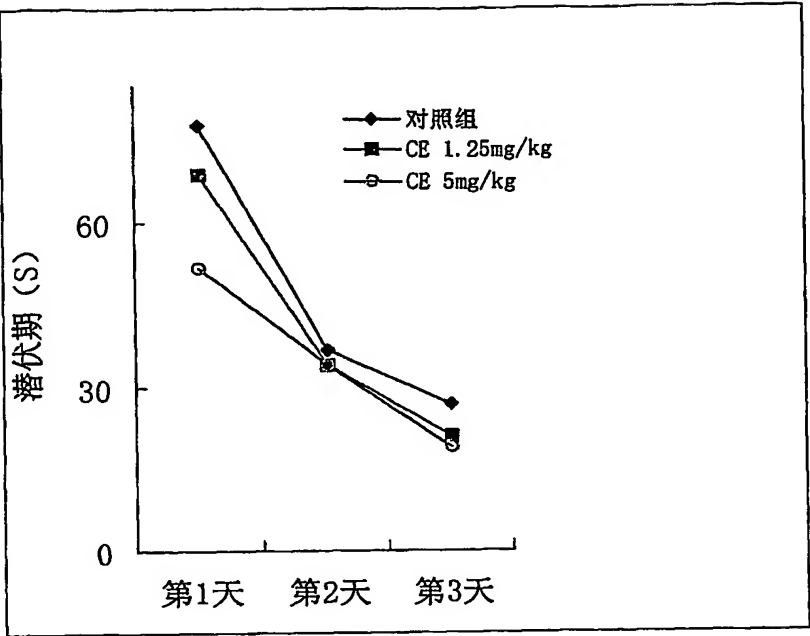


Fig. 2

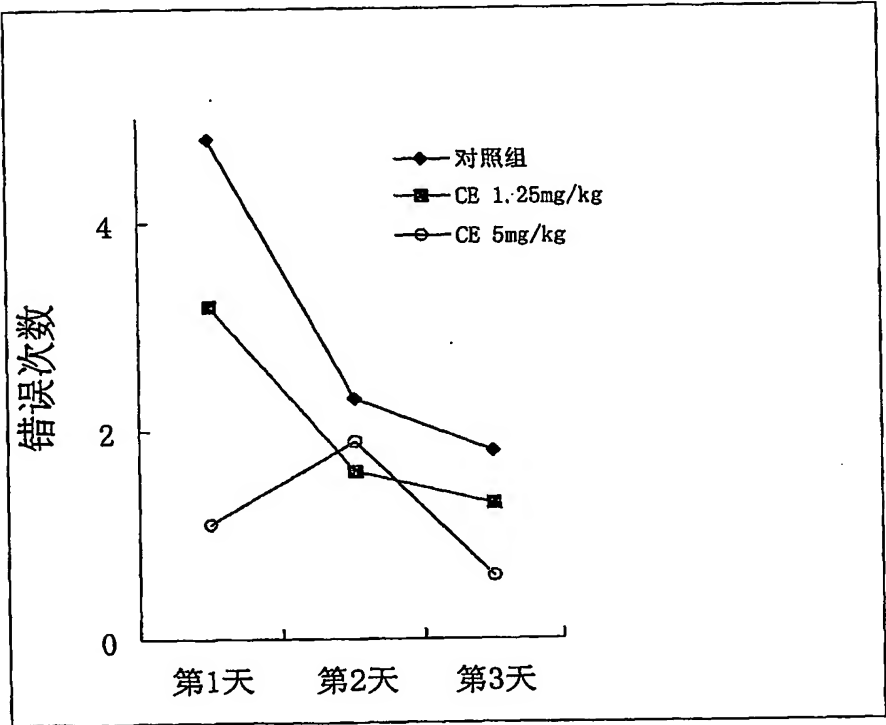


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN03/01155

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/222,31/194,31/7012,31/7028, A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CPRS、CNKI、CA

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Chinese Pharm Patent Database: Wangla

CPRS, CNKI: WPI, PAJ:coeloglossum w viride, dactylorhin, loroglossin, militarine, succinate, malate, glucopyrano+, dementia, imbecile,aphrenia, aphronesia, cataphre

CA:molecular formulas.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Huang Shengyang et al. Studies on the Chemical Constituents of <i>Coeloglossum viride</i> (L.) hartm. Var. Bracteatum (willd.) Rchtr. Acta Pharmaceutica Sinica, Mar 2002, Vol. 37, No. 3, pages 199-203.	1-11
A	Huang shengyang et al. Studies on the Chemical Constituents of Tibetan Medicine Wangla(Rhizome of <i>Coeloglossum viride</i> Var. Bracteatum). China Journal of Chinese Materia Medica, Feb 2002, Vol. 27, No. 2, pages 551-554.	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

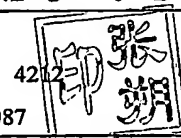
Date of the actual completion of the international search
25 Mar 2004

Date of mailing of the international search report
15 · 4月 2004 (15 · 04 · 2004)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

Telephone No. (86-10)62085087



4212

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN03/01155

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Huang shengyang et al., Two New Isobutyltartrate Monoesters from <i>Coeloglossum viride</i> (L) Hartm. Var. <i>Bracteatum</i> (Willd.) Richter. Chinese Chemical Letters, Jun 2002, Vol. 13, No. 6, pages 551-554.	1-11
A	Haruhisa Kizu et al., Studies on Nepalese Crude Drugs .XXVI. Chemical Constituents of Panch Aunle, the Roots of <i>Dactylorhiza hatagirea</i> D.Don. Chem. Pharm. Bull., Nov 1999, Vol. 47, No. 11, pages 1618-1625.	1-11
A	Robert W. Gray et al., Die Konstitution des Loriglossins. Helv. Chem. ACTA., Apr. 1977, Vol. 60, No. 4, pages 1305.	1-11

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN03/01155

A. 主题的分类

A61K31/222,31/194,31/7012,31/7028, A61P25/28

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC7, A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

CPRS、CNKI、CA

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

中国中药专利数据: 旺拉

CPRS, CNKI: 凹舌兰, 旺拉, 掌参, 佛手参, 手儿参, 阴阳草, 丁二酸, 琥珀酸, 苹果酸, 吡喃葡萄糖, cocloglossum, 痴, 呆,

WPI, PAJ: cocloglossum w viride, dactylorhin, loroglossin, militarine, succinate, malate, glucopyrano+, dementia, imbecile, aphrenia, aphronesia, cataphre

CA: molecular formulas.

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	药学报, 第 37 卷, 第 3 期, 2002 年 3 月出版, 黄胜阳 “长苞凹舌兰化学成分研究”, 第 199 至 203 页	1-11
A	中国中药杂志, 第 27 卷, 第 2 期, 2002 年 2 月出版, 黄胜阳 “藏药旺拉化学成分的研究”, 第 118 至 120 页	1-11
A	Chinese Chemical Letters, 第 13 卷, 第 6 期, 2002 年 6 月出版, HUANG, Shengyang “Two New Isobutyltartrate Monoesters from <i>Coeloglossum viride</i> (L.) Hartm. Var. <i>bracteatum</i> (Willd.) Richter”, 第 551 至 554 页	1-11

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

“L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

25.3 月 2004 (25.03.04)

国际检索报告邮寄日期

15.4 月 2004 (15.04.2004)

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员



电话号码: (86-10)62085087

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN03/01155

C(续). 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	Chem. Pharm. Bull., 第 47 卷, 第 11 期, 1999 年 11 月出版, Haruhisa Kizu et al., "Studies on Nepalese Crude Drugs .XXVI. Chemical Constituents of Panch Aunle, the Roots of <i>Dactylorhiza hatagirea</i> D.Don", 第 1618 至 1625 页	1-11
A	Helv. Chem. ACTA., 第 60 卷, 第 4 期, 1977 年 4 月出版, Robert W. Gray et al., "Die Konstitution des Loroglossins", 第 1305 页	1-11